

Das Phänomen der Lymphocytenanttransformation in der Pathogenese und Diagnostik von Autoimmunerkrankungen

H. WARNATZ

Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses
Erlangen-Nürnberg (Vorstand: Prof. Dr. F. SCHEIFFARTH)

Eingegangen am 5. September 1968

Medizinische
Habilitationsschrift
Erlangen



The Phenomenon of Lymphocyte Transformation in the Diagnosis and Pathogenesis of Autoimmune Diseases

Summary. Studies were performed on the importance of the lymphocyte transformation test in the diagnosis of autoimmune diseases. Lymphocyte cultures of 145 patients suffering from various chronic liver diseases were investigated. A significantly increased transformation rate after addition of autologous liver extract only could be observed in the case of chronic hepatitis and cirrhosis, whereas, the blast cell formation was not enhanced in cultures of healthy persons and patients with fatty liver.

Lymphocytes of patients with different joint diseases were cultured with autologous and/or homologous synovial extracts. In rheumatoid arthritis the transformation rate was increased fourfold compared with that in infectious or degenerative joint diseases. Lymphocyte cultures of patients with visceral lupus erythematosus also showed an increase in blast cell formation after addition of heterologous or homologous DNA. In colitis ulcerosa on the average the transformation rate was duplicated in cultures with added autologous colon extract; but the increase was statistically not significant because in other diseases of the colon and also in patients with normal histology of the colon the blast cells also were increased up to 10% of the cultured lymphocytes.

In parallel investigations experimental autoimmune diseases were produced in animals. The results of the lymphocyte transformation test in these immunologically induced diseases were proved for their diagnostic reliability. In allergic encephalomyelitis and immune thyroiditis of the guinea pig as well as in the experimental hepatitis of the mouse a significant increase of the transformation rate after addition of the autologous organ extract could be observed. There exists a good correlation between the percentage of blast cells in the lymphocyte cultures and the intensity of clinical and morphological organ lesions. In the nephrotoxic serum nephritis of the rat no stimulation of the blast cell formation could be demonstrated after addition of renal extract. According to these results the lymphocyte transformation test is a suitable method for the diagnosis and control of autoimmune diseases in which immune reactions of delayed type are involved.

Key-Words: Lymphocyte transformation — Chronic hepatitis, rheumatoid arthritis — Colitis ulcerosa — Experimental allergic encephalomyelitis — Immune thyroiditis — Experimental hepatitis — Nephrotoxic serumnephritis.

Zusammenfassung. Die diagnostische Wertigkeit des Lymphocytenanttransformationstests wurde bei einer Reihe chronischer Organerkrankungen geprüft, in deren Pathogenese Autoimmunprozessen eine wesentliche Bedeutung beigemessen wird. Dieser Test beruht auf der Beobachtungstatsache, daß Lymphocyten sensibilisierter Personen bei Kontakt mit dem spezifischen Antigen in der Zellkultur eine Umwandlung in lymphoblastenähnliche Zellen erfahren.

Bei Lymphocytenkulturen von 145 Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen konnte eine signifikante Steigerung der Transformationsrate nach Zugabe von autologem Leberextrakt in Fällen von chronischer Hepatitis und Cirrhose nachgewiesen werden. Eine erhöhte Transformationsrate fand sich in den Kulturen von Lebergesunden oder Patienten mit Leberverfettung nicht.

Lymphocyten von 50 Patienten mit primär chronischer Polyarthrits zeigten im Lymphocytenanttransformationstest eine vierfach gesteigerte Transformationsrate gegenüber den Lymphocyten von 49 Patienten mit Gelenkleiden infektiös-entzündlicher oder degenerativer Art. Bei Zugabe von homologer Desoxyribonikleinsäure zu Lymphocytenkulturen von Patienten mit Lupus erythematosus disseminatus acutus nahm die Zahl transformierter Zellen ebenfalls zu. Bei Colitis ulcerosa-Kranken ergab sich eine Steigerung der Transformationsrate von Lymphocyten bei Kontakt mit Colonextrakt auf das Doppelte. Eine statistische Sicherung der Befunde war hier im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht möglich.

Parallel zu den klinischen Untersuchungen wurden tierexperimentelle Autoimmunopathien induziert und der Lymphocytenanttransformationstest bei diesen immunologischen Organschädigungen geprüft. Bei der allergischen Encephalomyelitis und der Immunthyreoiditis des Meerschweinchens sowie der experimentellen Hepatitis der Maus fand sich nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen eine signifikante Steigerung der Transformationsrate bei Zusatz des sensibilisierenden Antigens zu den Kulturen. Der Prozentsatz transformierter Lymphocyten lag um so höher, je ausgeprägter die klinische bzw. morphologische Organschädigung war. Bei der nephrotoxischen Serumnephritis konnten derartige Beziehungen nicht statistisch gesichert werden.

Der Lymphocytenanttransformationstest ist eine Methode zur Beurteilung der Immunreaktionen vom verzögerten Typ, bei denen bislang nur die Intracutan-
testung, die cytotoxische Reaktion und die Inhibition der Makrophagenmigration als Untersuchungsmethoden zur Verfügung standen. Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen ist der Lymphocytenanttransformationstest eine geeignete Methode für die Diagnostik und Verlaufskontrolle von Autoimmunopathien. Er ist damit eine wertvolle Bereicherung der immunologisch diagnostischen Untersuchungsverfahren und ein wichtiges Hilfsmittel in der Pathogeneseforschung von Autoimmunopathien.

Schlüsselwörter: Lymphocytenanttransformationstest — chronische Hepatitis, primär chronische Polyarthrits — Colitis ulcerosa — experimentelle allergische Encephalomyelitis — Immunthyreoiditis — experimentelle Hepatitis — nephrotoxische Serumnephritis.

Auf Grund experimenteller und klinischer Forschungsergebnisse kommt dem lymphoreticulären System bei der Entstehung von Autoimmun-
erkrankungen eine entscheidende Rolle zu. Bei einer Reihe tierexperimenteller autoallergischer Erkrankungen ließ sich nachweisen, daß die Lymphocyten den immunologischen Pathomechanismus auslösen und übertragen können. Eine Methode, um die immunologische Aktivität

von Lymphocyten in vitro zu testen, ist der Lymphocytenanttransformations-test (LTT). Er geht von der Beobachtungstatsache aus, daß kleine Lymphocyten unter Antigeneinfluß sich in große lymphoblastenähnliche Zellen umwandeln, eine gesteigerte Mitoserate zeigen und einen erhöhten RNS- und DNS-Stoffwechsel besitzen, wie durch den Einbau von H^3 -Thymidin bzw. H^3 -Cytidin in die Zelle nachgewiesen werden kann. Transformierende Zellen besitzen eine erhöhte Proteinsynthese sowie eine vermehrte Aktivität hydrolytischer, oxydativer und glykolytischer Fermente. Ihr Sauerstoffverbrauch ist im Vergleich zu dem nicht transformierter Zellen erhöht [1, 8, 9, 13, 14, 21 c].

Dem Phänomen der Lymphocytenanttransformation wurde besondere Aufmerksamkeit geschenkt, als man erkannte, daß es sich hierbei um einen immunologischen Vorgang handelt. Zahlreiche Antigene wurden auf ihr Vermögen, Lymphocyten sensibilisierter Personen zu transformieren, untersucht. Im Mixed lymphocyte culture test hat der LTT eine Anwendung in der Histokompatibilitätstestung vor Organtransplantation gefunden.

Zielsetzung der nachfolgenden Untersuchungen war es zu prüfen, inwieweit der LTT neue Möglichkeiten für die Diagnostik von Autoimmunerkrankungen bietet. Die Untersuchungen wurden an Patienten mit chronischer Hepatitis, Colitis ulcerosa, primär chronischer Polyarthrit und Lupus erythematosus disseminatus acutus vorgenommen. Lymphocyten des peripheren Blutes der Kranken wurden auf ihre Transformationsfähigkeit unter dem Einfluß autologen Organextraktes untersucht. Parallel dazu wurden Serumuntersuchungen zum Nachweis zirkulierender Autoantikörper ausgeführt.

Durch Sensibilisierung wurden Organerkrankungen im Tierexperiment erzeugt und der LTT bei diesen experimentellen Autoimmunopathien geprüft. Die Untersuchungen wurden an der experimentellen allergischen Encephalomyelitis des Meerschweinchens, der experimentellen Immuntyreoiditis des Meerschweinchens, der experimentellen Hepatitis der Maus und der experimentellen Nephritis der Ratte ausgeführt. Die serologischen Untersuchungen sollten das Auftreten zirkulierender Antikörper im Verlauf der immunologisch bedingten Organschädigungen zeigen.

Methodik

A. Technik des Lymphocytenanttransformationstestes [3, 15]

1. *Gewinnung von Lymphocyten aus Venenblut.* Den Patienten wurden je 20 ml Venenblut, das durch Zugabe von 0,2 ml Heparin ungerinnbar gemacht wurde, steril entnommen. Das Blut wurde im Brutschrank bei 37°C ca. 1 Std aufbewahrt, danach das überstehende Plasma abgehebert. Zur Abtrennung der Lymphocyten wurde die Haftfähigkeit von Granulocyten an Glaswänden ausgenützt. Dadurch wurde eine Anreicherung der Lymphocyten auf durchschnittlich 60–80% der Leukocyten erzielt. Die im Plasma enthaltenen Leukocyten wurden bei 1500 U/min

10 min lang abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit Hankslösung auf 1 ml aufgefüllt; anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

2. *Gewinnung von Lymphocyten aus Lymphknoten.* Bei den experimentell erzeugten Autoimmunerkrankungen wurden die Lymphocyten aus den Lymphknoten gewonnen. Dazu wurden die inguinalen, axillären und nuchalen, teilweise auch die paraaortalen Lymphknoten steril entnommen. Die Organe wurden nach Befreiung von umliegendem Fettgewebe in Hankslösung steril mit Pinzetten zerzupft. Die Zahl der in Hankslösung suspendierten Zellen wurde in der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt.

3. *Gewinnung von Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus.* Bei einem Teil der Rattenversuche wurden Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus verwendet. Der Ductus thoracicus der Ratte wurde in üblicher Weise mit einem PVC-Schlauch drainiert [2] und die herausfließende Lymphe in einer Flasche aufgefangen, in der sich Eagles-Nährmedium mit Heparinzusatz bei 37°C befand. Während der Zeit der Ductus-Drainage, die durchschnittlich 12–24 Std dauerte, wurden die Ratten in einem Käfig fixiert und bekamen reichlich zucker- und eiweißhaltige Flüssigkeit zu trinken. Die gewonnene Lymphe wurde abzentrifugiert und die Zellzahl der Lymphocyten im Zellsediment bestimmt.

4. *Zellkulturen.* Die Zellkulturen wurden in einem Nährmedium der Zusammensetzung 80% Eagles synthetisches Gewebekulturmedium (Behring-Werke) und 20% nicht inaktiviertes homologes Serum unter Zusatz von 100 E Penicillin und 0,1 mg Streptomycin pro Milliliter Medium angesetzt. Für die Züchtung menschlicher Lymphocyten wurde Serum von Spendern der Blutgruppe AB positiv verwendet. Für die Tierversuche wurde im allgemeinen gepooltes homologes Serum von Normaltieren benutzt. Dieses wurde bei Meerschweinchen durch Herzpunktion, bei Ratten durch Aortenpunktion gewonnen. Die Kulturen der Mäuselymphocyten wurden mit fetalem Kälberserum gezüchtet. Das pH des Nährmediums wurde auf einen Wert von 7,4 mit einer 4% Natriumbicarbonatlösung eingestellt. Die Sterilisation des Nährmediums erfolgte durch Filtrieren durch Seitzfilterschichten.

Die Lymphocyten wurden bei 37°C in Vierkantflaschen gezüchtet, in die jeweils 10 ml Nährmedium eingefüllt wurden. Zu den 10 ml Nährmedium wurden $10 \cdot 10^6$ Lymphocyten zugegeben. Bei jedem Versuch wurden mindestens drei Kulturen angesetzt: eine Kultur (N-Kultur) wurde ohne einen weiteren Zusatz gezüchtet. Zu einer zweiten Flasche (E-Kultur) wurde das Homogenisat eines autologen Gewebestückchens hinzugegeben. Die dritte Flasche (P-Kultur) wurde mit 0,2 ml Bacto-Phytohämagglutinin M (Difco-Laboratories, Detroit USA) versetzt.

5. *Herstellung der Objektträgerpräparate.* Die Entnahme der Lymphocyten erfolgte aus den P-Kulturen nach 72 Std. Die N- und die E-Kulturen wurden nach 120stündiger Kultivierung entnommen. Die Zellen wurden mit einer Saugpipette vom Boden der Kulturflaschen abgespült und die Zahl der morphologisch intakten Zellen ermittelt. Zur Anfertigung der cytologischen Präparate wurde die Zellsuspension bei 700 U/min 10 min lang zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 5 ml Hankslösung resuspendiert und ein Tropfen eines Fixativs der Zusammensetzung 3 Teile Äthanol und 1 Teil Eisessig zugegeben. Nach erneutem Abzentrifugieren bei 1000 U/min wurde das Zellsediment mit 5 ml Fixativ obiger Zusammensetzung aufgefüllt. Die fixierten Zellen wurden auf einen tiefgekühlten Objektträger ausgeblasen und die Präparate nach PAPPENHEIM gefärbt. Der Prozentsatz transformierter Lymphocyten in 2000 Zellen wurde nach morphologischen Kriterien ausgezählt.

6. *Autoradiographie.* Bei einem Teil der Kulturen wurden zusätzlich Autoradiogramme angefertigt [22]. Diesen Lymphocytenkulturen wurden $20 \mu\text{C H}^3\text{-Thymin}$ der spezifischen Aktivität 3000 mC/mM (Radiochemical Centre Amersham, England) zugegeben. Die Kulturen wurden in der gleichen Weise gezüchtet, wie oben

beschrieben. Nach Entnahme aus den Kulturflaschen wurden die Zellen wie üblich fixiert. Die Herstellung der Autoradiogramme erfolgte nach der Filmstrippingmethode mit Kodakplatten Typ AR 10. Nach einer Expositionszeit von 21 Tagen wurden die Autoradiogramme entwickelt, nach PAPPENHEIM gefärbt und die Zahl der markierten Zellen unter 1000 Zellen ausgezählt.

7. *Bestimmung der Mitoserate.* Bei einigen Kulturen menschlicher Lymphocyten wurden parallele Bestimmungen der Mitoserate ausgeführt. Dabei wurde in die Kulturflaschen 3 Std vor Entnahme der Lymphocyten 0,4 mg Colcemid (Ciba) zugegeben. Die Fixierung der Präparate erfolgte entsprechend den obigen Angaben. Die Präparate wurden mit einer 1%igen Orceinlösung gefärbt. Die in der Metaphase gestoppten Mitosen wurden auf 1000 Zellen ausgezählt.

B. Untersuchungsgut

I. Klinische Untersuchungen

1. *Lebererkrankungen.* Insgesamt wurden Untersuchungen mit dem Lymphocytentransformationstest bei 145 Patienten vorgenommen. Bei allen Patienten war die Diagnose auf Grund klinischer Kriterien und pathologisch-histologischer Untersuchung von Leberbiopsiematerial gesichert. Die Zusammensetzung des Krankengutes geht aus der Tabelle 1 hervor. Als Extrakt wurde für die E-Kultur regelmäßig autologes Leberbiopsiematerial verwendet. Zum Nachweis zirkulierender Leberautoantikörper wurden Serumuntersuchungen mit der passiven Hämagglutinationstechnik nach BOYDEN [29] und mit der Immunfluoreszenztechnik [29] unter Verwendung von homologem Lebergewebe als Antigen ausgeführt.

2. *Gelenkerkrankungen.* Das Krankengut von insgesamt 111 Patienten verteilte sich auf die einzelnen Gelenkerkrankungen entsprechend der Tabelle 3a. Die Diagnosen waren auf Grund klinischer und serologischer Untersuchungen gesichert. An serologischen Untersuchungen kamen zur Anwendung:

a) Untersuchungen zum Nachweis des Rheumafaktors [29].

1. Latexfixationstest nach SINGER u. PLOTZ.

2. Waaler-Rose-Reaktion modifiziert nach SVARTZ u. SCHLOSSMANN.

3. Inhibitionstest nach ZIFF [37]; dieser Test nur bei fraglich seronegativen Fällen von primär chronischer Polyarthritis.

b) Untersuchungen zum Nachweis antinucleärer Antikörper [10]; diese Tests nur bei Verdacht auf das Vorliegen einer Kollagenkrankheit.

1. LE-Latextest.

2. Antiglobulinkonsumptionstest unter Verwendung von Kalbsthymuskernen als Antigen.

3. DNS-Bentonittest.

4. Immunfluoreszenztechnik unter Verwendung von Kaninchenleber als kernhaltigem Material und Nachweis der Bindung von antinucleären Antikörpern mit einem fluoreszenzmarkierten Anti-IgG-Serum (Behring-Werke).

c) Untersuchung der Synovialflüssigkeit auf Ragocyten [5].

Beim Lymphocytentransformationstest wurde als antigener Extrakt für die E-Kulturen in 16 Fällen autologes Synovialgewebe verwendet, in den übrigen E-Kulturen wurde ein homologes Synovialgewebe, das aus dem Kniegelenk eines Patienten mit primär chronischer Polyarthritis stammte, benutzt. Bei den Fällen von Lupus erythematosus disseminatus acutus wurden zusätzlich E-Kulturen mit homologer Desoxyribonucleinsäure als antigenem Extrakt (sog. DNS-Kulturen) angesetzt.

3. *Dickdarmkrankungen.* Die 30 Patienten hatten nach dem Ergebnis der Rectumschleimhautuntersuchung die in der Tabelle 5 angegebenen histologischen Befunde. Für die E-Kulturen wurde hier der Extrakt aus der autologen durch

Zangenbiopsie gewonnenen Rectumschleimhaut verwendet. In zusätzlichen Kulturen kam das Rectumschleimhauthomogenisat eines Operationspräparates zur Anwendung, das bei histologischer Kontrolle unauffällig war. Um das Wachstum von Bakterien in der Zellkultur zu verhindern, wurde die Rectumschleimhaut mit einer 10%igen Binotallösung gespült und anschließend mit Hankslösung mehrmals gewaschen. Parallel wurde autologe Dickdarmschleimhaut auf gewebsgebundene Antikörper mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik [29] untersucht.

II. Experimentelle Autoimmunopathien

1. *Experimentelle allergische Encephalomyelitis.* Um die experimentelle allergische Encephalomyelitis zu erzeugen, wurde entsprechend den Angaben der Literatur vorgegangen [18, 35]. 30 pir-bright Meerschweinchen eines durchschnittlichen Körpergewichts von 200 g wurden 10 mg eines homologen Hirnextraktes intracutan injiziert. Der Hirnextrakt wurde durch Homogenisieren von 1 g Meerschweinchenhirn mit 3,5 ml Hankslösung und 3,5 ml Freundschem Adjuvans bereitet. Nach durchschnittlich 10–20 Tagen trat bei 85% der Meerschweinchen ein Lähmungsbild auf, das in der Regel mit einer Lähmung des Sphincter ani bzw. einer Parese der Hinterläufe begann. Nach Auftreten der ersten Lähmungen gingen die Tiere durchschnittlich nach 3–5 Tagen unter den Zeichen einer fortschreitenden Kachexie zugrunde. Die gelähmten Tiere wurden getötet, das Blut durch Herzpunktion entnommen und das Gehirn nach Eröffnen der Schädelkalotte herauspräpariert. Vom Gehirn wurden histologische Schnitte hergestellt und diese auf das Vorhandensein der typischen morphologischen Veränderungen (perivasculäre Infiltrate, Infiltrate von mononucleären Zellen submeningeal oder im Bereich des Plexus chorioideus) untersucht. Derartige Veränderungen wurden bei sämtlichen gelähmten Tieren nachgewiesen.

Die Lymphknoten der Tiere wurden entfernt und Lymphocytenkulturen hergestellt. In Kontrollkulturen wurden Lymphocyten unbehandelter Tiere und von Tieren, denen nur Freundsches Adjuvans injiziert worden war, gezüchtet. Als antigener Extrakt wurde in den sog. H-Kulturen autologer Hirnextrakt, in den L-Kulturen autologer Leberextrakt verwendet. Sämtliche Kulturen wurden mit H^3 -Thymin versetzt und die Transformationsrate in den Autoradiogrammen bestimmt.

2. *Experimentelle Immunthyreoiditis.* Bei der Erzeugung der Immunthyreoiditis wurde nach den Angaben der Literatur vorgegangen [21, 25]. 30 pir-bright Meerschweinchen des durchschnittlichen Körpergewichts von 200 g wurden für diesen Versuch verwendet. Eine erste Versuchsserie erhielt 0,6 ml eines homologen Thyreoidea-Homogenisats (Zusammensetzung 1 g Thyreoidea + 9 ml Hankslösung + 10 ml Freundsches Adjuvans) in die vier Pfoten und intracutan in die Rückenhaut injiziert. Die Injektionen wurden intraperitoneal in wöchentlichem Abstand zwei- bis viermal wiederholt. Eine weitere Versuchsserie erhielt nur einmal 0,1 ml des homologen Thyreoideaextraktes obiger Zusammensetzung intracutan injiziert. 10 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet. Das Blut wurde zuvor durch Herzpunktion entnommen und auf zirkulierende Antikörper mit Hilfe der passiven Hämagglutinationstechnik nach BOYDEN und mit der Immunfluoreszenzmethode [29] unter Verwendung von homogologer Thyreoidea als Antigen untersucht. Die Schilddrüsen der Versuchstiere wurden histologisch untersucht; die Auswertung erfolgte nach dem Schweregrad der Immunthyreoiditis, d. h. nach der Intensität der herdförmigen oder diffusen Infiltration des interstitiellen Bindegewebes mit mononucleären Zellen und der Zerstörung von Schilddrüsenzellen. Für die Kontrollversuche wurden mit Freundschem Adjuvans behandelte und unbehandelte Meerschweinchen verwendet.

Die Lymphknoten dieser Tiere wurden für den Lymphocytenanttransformationstest verwendet. Als Extrakt diente autologer Schilddrüsenextrakt für die sogenannten T-Kulturen und autologer Leberextrakt für die sogenannten L-Kulturen. Die Kulturen wurden mit H^3 -Thymidin versetzt und Autoradiogramme angefertigt.

3. *Experimentelle Hepatitis* [28]. Als Versuchstiere wurden 25 Mäuse des Inzuchtstammes C 57 Bl verwendet. Die Sensibilisierung erfolgte mit einem homologen von Inzuchtstamm AKR gewonnen Leberextrakt (Zusammensetzung 1 g Leber + 2 ml Hankslösung + 3 ml Freundsches Adjuvans). Den Tieren wurde dieser Leberextrakt zweimal wöchentlich über insgesamt 4 Wochen teils intramuskulär, teils ohne Freundsches Adjuvans intraperitoneal injiziert. 10 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet. Die Leber wurde zur histologischen Beurteilung entnommen. Die Leberveränderungen wurden nach dem Schweregrad der Infiltration der periportaln Felder mit mononucleären Zellen, der Vermehrung der Kupferschen Sternzellen mit Sternzellknötchenbildung und dem Ausmaß der Leberparenchymzellnekrosen ausgewertet. Den Mäusen wurden die Lymphknoten entnommen und die Kulturen der Lymphknotenlymphocyten wie üblich angesetzt. Als Antigen wurde isolierter Leberextrakt eines C 57 Bl-Tieres verwendet. Die Auswertung der Kulturpräparate erfolgte durchwegs autoradiographisch. Für die Kontrollversuche wurden C 57 Bl-Mäuse benutzt, die mit Freundschem Adjuvans ohne Leberextraktzusatz injiziert worden waren.

4. *Nephrotoxische Serumnephritis*. Die Nephritis der Ratte wurde mit einem heterologen Antirattennierenserum von Kaninchen entsprechend den Angaben der Literatur [33] erzeugt. Die Versuche wurden an Wistarratten eines durchschnittlichen Gewichts von 200 g durchgeführt. Zur Erzeugung des Antirattennierensersums wurden Kaninchen mit 3 ml eines Rattennierenextraktes (Zusammensetzung 1,5 g Rattenniere + 1,5 ml Freundsches Adjuvans) teils intramuskulär, teils subcutan injiziert. Anschließend erhielten die Kaninchen in wöchentlichem Abstand 0,5 ml Nierenextrakt appliziert. Nach 5 Wochen wurde die Sensibilisierung abgebrochen und 10 Tage später Blut aus der Ohrvene entnommen. Der Antikörpernachweis wurde im Serum mit der Agardoppeldiffusionstechnik nach OUCHTERLONY geführt; dabei fanden sich präzipitierende Antikörper gegen mindestens vier Fraktionen des Rattennierenextraktes. Präzipitierende Antikörper konnten bis zu einer Verdünnung des Serums von 1:32 nachgewiesen werden. Bei Untersuchung mit der passiven Hämagglutinationstechnik nach BOYDEN betrug der Antikörpertiter 1:256. Das Immenserum wurde in fünf bis zehn Einzeldosen zu je 0,5 ml intravenös 30 Wistarratten in die Schwanzvene injiziert. 2 Tage nach der letzten Injektion wurden die Ratten getötet, nachdem zuvor das Blut durch Aortenpunktion entnommen worden war. Die Nieren der Tiere wurden herauspräpariert und auf histologische Veränderungen untersucht. Alle Versuchstiere hatten kurz vor der Tötung einen positiven Eiweißbefund im Urin. Als Kontrolltiere dienten 20 Wistarratten, die mit einem Kaninchennormalserum in gleicher Weise behandelt wurden.

Den Ratten wurden die Lymphknoten entnommen und Lymphocytenkulturen angelegt. Bei einem Teil der immunisierten Ratten wurden die Lymphocyten auch aus dem Ductus thoracicus gewonnen.

Den Kulturen wurden folgende Extrakte zugegeben:

1. ohne Zusatz,
2. 0,2 ml Phytohämagglutinin M,
3. autologer Nierenextrakt,
4. Antirattennierenserum vom Kaninchen,
5. autologer Nierenextrakt + Antirattennierenserum,
6. autologer Nierenextrakt + Kaninchennormalserum.

Die Auswertung der Kulturen erfolgte nach Zugabe von H^3 -Thymidin autoradiographisch.

Die Nieren der Versuchstiere wurden auf gebundenes Kaninchen-Gammaglobulin bzw. auf gebundenes Ratten-Gammaglobulin mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode [29] untersucht. Zirkulierende Nierenautoantikörper wurden mit Hilfe der passiven Hämagglutinationstechnik nach BOYDEN bestimmt.

Statistische Auswertung. Bei den in den Tabellen 1—12 zusammengestellten Ergebnissen wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen der Einzelwerte errechnet. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte nach der t-Verteilung, wobei eine Signifikanz dann angenommen wurde, wenn ein $p \leq 0,02$ errechnet wurde [6, 12].

Ergebnisse

A. Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes bei den klinischen Untersuchungen

1. Ergebnisse bei Lebererkrankungen. Die Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstests bei Lebererkrankungen sind in der Tabelle 1 zusammengestellt. Es zeigte sich, daß die Zahl der transformierten Lymphocyten in den N-Kulturen unter $50^0/_{00}$ lag. Die Transformationsrate der

Tabelle 1. *Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes bei Lebererkrankungen. Die Zahlen geben die Mittelwerte der Transformationsraten und die Standardabweichungen der Einzelwerte für die Kulturen ohne Zusatz (N-Kultur), die Kulturen mit Zusatz des Homogenats von autologem Leberbiopsiematerial (E-Kultur) und Kulturen mit Zusatz von Phytohämagglutinin (P-Kultur) in Promille wieder. Die in Kursiv hervorgehobenen Werte der E-Kulturen unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,02$) von den Werten der N-Kulturen*

Diagnose	Zahl der Fälle	Transformationsrate in Promille		
		N-Kultur	E-Kultur	P-Kultur
Normalbefund	38	35,4 $\pm$ 27,29	45,3 $\pm$ 28,27	599,6 $\pm$ 117,75
Verfettung	43	31,3 $\pm$ 24,93	43,7 $\pm$ 31,48	584,4 $\pm$ 253,22
Fettleber	13	17,6 $\pm$ 18,81	30,5 $\pm$ 32,56	616,3 $\pm$ 253,78
Zustand nach Hepatitis	15	50,0 $\pm$ 39,98	91,7 $\pm$ 56,73	535,0 $\pm$ 253,45
Chronische Hepatitis	23	49,2 $\pm$ 31,39	192,9 $\pm$ 140,54	540,6 $\pm$ 235,44
Cirrhose	13	48,0 $\pm$ 25,88	169,3 $\pm$ 42,93	481,3 $\pm$ 195,77

E-Kulturen wurde bei histologischen Normalbefunden, Leberepithelverfettung und Fettleber ebenfalls unter der $50^0/_{00}$ -Grenze bestimmt. Bei der chronischen Hepatitis und der aktiven Cirrhose wurden demgegenüber 193 bzw. $169^0/_{00}$ als Transformationsrate ermittelt. Sie ist bei diesen beiden Erkrankungen signifikant gesteigert. Eine deutliche Erhöhung der Zahl transformierter Zellen fand sich auch bei den Patienten mit Zustand nach Hepatitis, deren Lymphocyten nach Abklingen der akuten Krankheitserscheinungen bis zu $1\frac{1}{2}$ Jahr nach Ausbruch der Erkrankung untersucht wurden.

Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen des Lymphocyten-transformationstestes ließen sich für die verschiedenen Lebererkrankungen keine Korrelationen beim Nachweis zirkulierender Antikörper sichern. Die Ergebnisse, die beim gleichen Krankengut mit der passiven Hämagglutinationstechnik nach BOYDEN bzw. mit der Immunfluoreszenztechnik erhoben wurden, sind in der Tabelle 2 wiedergegeben. Zirkulierende Antikörper, die mit homologem Leberextrakt bzw. mit homologem Lebergewebsschnitten zu reagieren vermögen, finden sich danach in allen Untersuchungsgruppen.

Tabelle 2. *Ergebnisse der Serumuntersuchungen auf zirkulierende Antikörper mit der passiven Hämagglutinationsreaktion nach BOYDEN (+ = Titer von 1:16 bis 1:128, ++ = Titer über 1:128) und mit der Immunfluoreszenztechnik (Nachweis von Fluoreszenz des Cytoplasma der Leberparenchymzellen unter Verwendung eines Anti- β 1A/ β 1C-Serum. Nachweis von Kernfluoreszenz mit einem Anti-IgG-Serum)*

Diagnose	Zahl der Fälle	Pass. Hämagglutinationsreaktion nach BOYDEN			Immunfluoreszenz		
		$\emptyset$	+	++	Cytoplasma $\emptyset$	Kern +	Kern +
Normalbefund	31	19	8	4	21	10	0
Verfettung	38	21	12	5	19	19	0
Fettleber	12	8	2	2	8	4	0
Zustand nach Hepatitis	14	7	5	2	9	5	2
Chronische Hepatitis	18	10	5	3	10	8	2
Cirrhose	11	5	4	2	9	2	1

Bemerkenswerterweise konnten selbst in der Gruppe der normalen Leberbefunde mehrfach zirkulierende Antikörper gegen das Cytoplasma-antigen der Leberparenchymzellen gefunden werden. Antinucleäre Antikörper wurden nur in fünf Fällen nachgewiesen. Die beiden Fälle von chronischer Hepatitis, bei denen antinucleäre Antikörper gefunden wurden, erfüllten im übrigen die klinischen und morphologischen Kriterien der lupoiden Hepatitis, d. h. der hypergammaglobulinämischen, plasmacellulären Hepatitis [14a, 21 b] nicht. Beziehungen zwischen dem Nachweis zirkulierender Antikörper gegen Lebergewebe und dem Ausfall des Lymphocytentransformationstestes ergaben sich nicht. Insgesamt bestätigen die Befunde die Ergebnisse früherer Untersuchungen, daß der Nachweis zirkulierender Leberautoantikörper keine diagnostische Bedeutung besitzt [27].

Die Ergebnisse des Lymphocytentransformationstestes beweisen, daß die celluläre Immunreaktion und hier insbesondere die Lymphocyten bei der Entwicklung der chronischen Hepatitis eine entscheidende Bedeutung besitzen. Sie sind ein wesentliches Argument für die Annahme, daß auto-

Tabelle 3a. *Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes bei verschiedenen Gelenkerkrankungen. Die Zahlen geben die Mittelwerte der Transformationsraten bei Lymphocytenkulturen mit Zusatz von homologer Desoxyribonucleinsäure (DNS-Kultur), Kulturen mit Zusatz von autologem bzw. homologem Synovialextrakt (E-Kultur), Kulturen ohne Zusatz (N-Kulturen) und bei Kulturen mit Zusatz von Phytohämagglutinin M (P-Kultur) in Prozent wieder*

Diagnose	Zahl der Fälle	Mittlere Transformationsrate in Prozent			
		DNS-Kultur	N-Kultur	E-Kultur	P-Kultur
Arthrose	15	—	1,3	4,0	44,8
Gicht	4	—	2,4	3,5	49,0
Meniscusschaden	17	—	1,6	3,9	62,4
M. Bechterew	1	—	2,0	2,5	54,0
Psoriasis	2	—	6,0	11,2	59,0
Infektarthritis	7	—	2,3	4,4	57,6
HWI-Syndrom	5	—	4,2	4,8	37,9
Primäre chronische Polyarthrit	50	—	4,5	17,9	62,6
Lupus erythematosus	5	15,0	5,2	17,2	76,4
Progressive Sklerodermie	3	5,3	5,6	6,9	68,3
Dermatomyositis	3	4,2	4,2	8,7	59,0
Periarteritis nod.	1	—	8,0	23,0	82,0

Tabelle 3b. *Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes bei verschiedenen Gelenkerkrankungen. Die Zahlen geben die Mittelwerte der Transformationsraten bei der primär chronischen Polyarthrit und bei Arthritiden anderer Genese (außer Kollagenkrankheiten) und die Standardabweichungen der Einzelwerte wieder. Der in Kursiv hervorgehobene Wert ist signifikant ($p \leq 0,02$) von dem Wert der N-Kultur verschieden*

Diagnose	Zahl der Fälle	Transformationsrate in Prozent		
		N-Kultur	E-Kultur	P-Kultur
Primäre chronische Polyarthrit	50	4,5 $\pm$ 3,69	17,9 $\pm$ 10,82	62,6 $\pm$ 21,77
Arthritiden anderer Genese	49	2,1 $\pm$ 1,78	4,3 $\pm$ 2,94	52,7 $\pm$ 21,14

immunologische Prozesse bei dieser Erkrankung eine wesentliche Rolle spielen. Die Frage, ob es sich bei der chronischen Hepatitis um eine Autoimmunerkrankung handelt, kann allerdings auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht ohne weiteres bejaht werden, zumal auch bei Zustand nach Hepatitis epidemica, also einer Viruserkrankung, eine Steigerung der Transformationsbereitschaft von Lymphocyten nachweisbar ist. Insgesamt ist der Lymphocytenanttransformationstest geeignet, eine Routine-methode in der Diagnostik der chronischen Lebererkrankungen zu werden, wobei vorläufige Untersuchungsergebnisse es wahrscheinlich machen.

daß auch eine Korrelation zwischen der Transformationsrate und der Akuität der Hepatitis besteht.

2. *Ergebnisse bei den Gelenkerkrankungen.* Die Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes sind für die Gelenkerkrankungen in Tabelle 3a und 3b wiedergegeben. Der Lymphocytenanttransformationstest hatte nur in 2 von 50 Patienten mit primär chronischer Polyarthrititis ein negatives Ergebnis, d. h. die Transformationsrate betrug unter 5%, 86% der

Tabelle 4. *Ergebnisse der Serumuntersuchungen auf Rheumafaktor und antinucleäre Antikörper bei der primär chronischen Polyarthrititis und den Kollagenkrankheiten. Die Zahlen geben die Häufigkeit positiver Untersuchungsergebnisse mit den verschiedenen Nachweismethoden wieder. LF = Latexitixationstest, WR = Waaler-Rose-Reaktion, Ziff = Ziffische Inhibitionsreaktion. (^a Die Ziffische Reaktion fiel in 8 von 14 seronegativen Fällen von primär chronischer Polyarthrititis positiv aus.) LEL = LE-Latextest, AGKT = Antiglobulinkonsumptionstest, DNSB = DNS-Bentonittest, Ifl = Immunfluoreszenztechnik*

Diagnose	Zahl der Fälle	Nachweis des Rheumafaktors			Nachweis antinucleärer Antikörper			
		LF	WR	Ziff	LEL	AGKT	DNSB	Ifl
Primäre chronische Polyarthrititis	50	33	31	8 ^a	1	7	0	3
Lupus erythematosus	3	2	1	—	2	5	4	5
Sklerodermie	3	0	0	—	0	1	0	0
Dermatomyositis	3	1	1	—	0	1	0	0
Periarteriitis nod.	1	—	—	—	0	1	0	0

Patienten mit primär chronischer Polyarthrititis zeigten eine Transformationsrate über 10%. Demgegenüber war bei den Patienten mit Gelenkerkrankungen, die nicht dem Formenkreis der Kollagenkrankheiten zugerechnet werden, nur in 23.6% eine Transformationsrate über 5% nachweisbar. Über 10% transformierte Zellen wurden bei diesen Erkrankungen nicht beobachtet. Erhöhte Transformationsraten fanden sich auch bei den Kollagenosen, insbesondere bei visceralem Lupus erythematosus und bei der Periarteriitis nodosa. Beim Lupus erythematosus waren auch die Transformationsraten in den DNS-Kulturen erhöht.

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen bei der primär chronischen Polyarthrititis und den Kollagenosen sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt. Der Nachweis des Rheumafaktors gelang bei der primär chronischen Polyarthrititis in 72% der Fälle und zwar mit dem Latexitixationstest bei 33 und mit der Waaler-Rose-Reaktion bei 31 von 50 Patienten mit primär chronischer Polyarthrititis. Bei 3 von 59 Patienten mit Arthritiden anderer Genese ließ sich der Rheumafaktor nachweisen. Bei 8 von 14 seronegativen Fällen von primär chronischer Polyarthrititis

konnte der Rheumafaktor mit Hilfe des Inhibitionstestes nach ZIFF gefunden werden. Ragocyten konnten bei 14 von 17 Patienten mit primär chronischer Polyarthrit, deren Gelenkpunktat untersucht wurde, gefunden werden: sie wurden aber auch bei 6 von 21 Patienten mit Gelenkerkrankungen anderer Genese beobachtet.

Die Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes zeigen, daß diese Methode eine sichere Abgrenzung der primär chronischen Polyarthrit von Gelenkerkrankungen infektiös-entzündlicher oder degenerativer Genese gestattet, wenn als Maßstab eine Transformationsrate

Tabelle 5. Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes bei verschiedenen Colonerkrankungen. Die Zahlen geben die mittleren Transformationsraten der Lymphocytenkulturen ohne Zusatz (N-Kultur), der Kulturen mit autologem bzw. homologem Colonektraktzusatz (E-Kultur) und der Kulturen mit Phytohämagglutininzusatz (P-Kultur) in Prozent wieder

Diagnose	Zahl der Fälle	Mittlere Transformationsrate in Prozent		
		N-Kultur	E-Kultur	P-Kultur
Colitis ulcerosa	14	5,1	7,4	54,8
Colonerkrankungen anderer Genese	5	5,0	2,6	52,4
Normaler Colonbefund	11	3,7	6,3	53,1

über 10% angenommen wird. Der Test besitzt eine dem Rheumafaktor vergleichbare Sicherheit des Nachweises der primär chronischen Polyarthrit.

Im Gegensatz zum Rheumafaktortiter scheint der Lymphocytenanttransformationstest auch eine Abhängigkeit von der Akuität der Erkrankung zu besitzen. So normalisierte sich der Lymphocytenanttransformationstest bei Remissionen und nach Goldbehandlung bzw. immunsuppressiver Therapie. Eine Corticoidbehandlung beeinflusste die Transformationsrate im allgemeinen nur gering.

3. Ergebnisse bei Erkrankungen des Colons. Die Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt. Bei den Colitis ulcerosa-Kranken findet sich eine Steigerung der mittleren Transformationsrate auf 7,4%. Die Einzelwerte zeigen hier jedoch relativ große Schwankungen: fünf Colitis ulcerosa-Kranke hatten eine Transformationsrate von weniger als 5%. Andererseits fanden sich auch bei normalem Colonbefund häufig erhöhte Prozentsätze transformierter Zellen. Als Ursache der Schwankungen in den Transformationsraten kommen in erster Linie die unterschiedlichen Eigenschaften des Antigens in Betracht. In unseren Untersuchungen wurde entweder ein autologes Antigen (Rectum-Zangenbiopsie) oder ein homologes Antigen (Operations-

präparate von normaler Colonschleimhaut) verwendet. Die Schwankungen der Transformationsrate können in den Besonderheiten des Antigens (z. B. unterschiedliche bakterielle Antigene des Colonextraktes) begründet liegen und müssen nicht Ausdruck der Aktivität der Erkrankung sein. Zirkulierende Antikörper konnten fluoreszenzserologisch in 8 von 12 untersuchten Fällen von Colitis ulcerosa nachgewiesen werden; es handelte sich bei ihnen um anticytoplasmatische Antikörper.

Die mitgeteilten Untersuchungsergebnisse bei Colitis ulcerosa berechtigen nicht dazu, aus der Höhe der Transformationsrate der Lymphocyten Rückschlüsse auf immunologische Vorgänge bei der Erkrankung zu ziehen, bzw. die Colitis ulcerosa als eine Autoimmunerkrankung anzusehen. Untersuchungen an einem größeren Krankengut müssen hier Klarheit bringen.

B. Ergebnisse des Lymphocytentransformationstestes bei den tiereperimentellen Untersuchungen

1. Ergebnisse bei der experimentellen allergischen Encephalomyelitis. Bei den sensibilisierten Tieren war in 85% der Fälle eine allergische Encephalomyelitis mit neurologischen Ausfallsymptomen (Paresen der

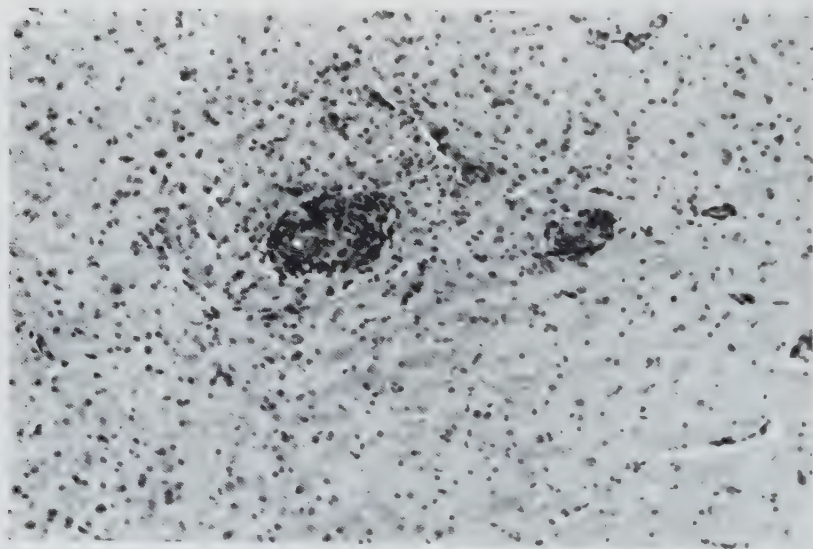


Abb. 1. Histologischer Schnitt des Gehirns eines Meerschweinchens mit experimenteller allergischer Encephalomyelitis

Hinterfüße und des M.sphincter ani bis zum vollkommenen Lähmungsbild) aufgetreten. Tiere, bei denen es nach Sensibilisierung nicht zu Lähmungen gekommen war, wurden für die Untersuchungen nicht verwendet.

Histologisch ließen sich bei allen gelähmten Tieren histologische Hirnveränderungen unterschiedlichen Schweregrades nachweisen. Die klinischen Befunde der allergischen Encephalomyelitis und die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen am Gehirn der sensibilisierten Tiere

Tabelle 6

Klinischer Befund und histologisches Ergebnis der Hirnuntersuchung bei Tieren mit allergischer Encephalomyelitis, aufgegliedert nach Schweregrad der Symptome

Schweregrad	Klinischer Befund	Histologischer Befund
Ø	0	0
+	11	10
++	16	17

Ø = Keine Lähmungen bzw. normaler histologischer Befund. + = Paresen einzelner Muskeln (z. B. Sphincter ani. Muskulatur der Hinterläufe) bzw. einzelne perivaskuläre Infiltrate und geringe mononucleäre Infiltration der Plexus chorioidei. ++ = Schweres Lähmungsbild, die gesamte Muskulatur betreffend bzw. zahlreiche perivaskuläre Infiltrate und ausgedehnte mononucleäre Infiltrate im Bereich der Plexus chorioidei und submeningeal.

Tabelle 7. *Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes bei Tieren mit allergischer Encephalomyelitis. Die Zahlen geben die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Transformationsraten in Prozent für die Lymphocytenkulturen ohne Zusatz (N-Kultur), für Kulturen mit Zusatz von Hirnextrakt (H-Kultur), für Kulturen mit Zusatz von Leberextrakt (L-Kultur) und für Kulturen mit Zusatz von Phytohämagglutinin M (P-Kultur) wieder. Die in Kursiv hervorgehobenen Werte der H- und L-Kulturen unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,02$) von dem Wert der N-Kultur. Die Zahlen in Klammern bedeuten die Anzahl der jeweils untersuchten Tiere*

	Transformationsrate in Prozent		
	Sensibilisierte Tiere (25)	Mit Freundschem Adjuvans behandelte Tiere (10)	Unbehandelte Tiere (17)
N-Kultur	1,65 ± 1,52	3,17 ± 2,08	1,05 ± 0,29
H-Kultur	11,96 ± 11,68	4,50 ± 1,96	3,56 ± 4,86
L-Kultur	6,02 ± 6,36	5,56 ± 1,78	3,62 ± 5,43
P-Kultur	33,68 ± 19,80	15,13 ± 2,72	15,02 ± 12,45

sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt. Die als Kontrollgruppe benutzten unbehandelten bzw. mit Freundschem Adjuvans injizierten Tiere zeigten sämtlich einen normalen neurologischen Befund und eine unauffällige Histologie des Gehirns.

Die Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes (Tabelle 7) lassen auf eine immunologische Aktivität der Lymphocyten bei Kontakt mit autologem Hirnextrakt schließen. Nach den Auswertungsergebnissen

der autoradiographischen Präparate zeigen die Lymphocyten, die von Tieren mit einer allergischen Encephalomyelitis stammten, eine starke Erhöhung der Transformationsrate nach Zusatz von Hirnextrakt, während in den entsprechenden Kulturen von Lymphocyten der Kontrolltiere eine Steigerung der Zahl radioaktiv markierter Zellen nicht beobachtet wurde. Bei Verwendung eines anderen Organextraktes, hier eines autologen Leberextraktes kam es zu keiner Steigerung der Zahl der transformierten Zellen.

Die Ergebnisse des Lymphocytentransformationstestes zeigen eine Korrelation zum Schweregrad des klinischen Bildes und der morphologischen Veränderungen in den Hirnpräparaten (Tabelle 8). Die Trans-

Tabelle 8. *Mittlere Transformationsraten der Lymphocytenkulturen mit Hirnextrakt-zusatz von Tieren mit allergischer Encephalomyelitis, die nach dem Schweregrad des klinischen bzw. histologischen Befundes als + oder ++ eingestuft wurden*

Schweregrad	Mittlere Transformationsrate der H-Kulturen	
	nach klinischem Befund	nach histologischem Befund
+	9,15	10,50
++	13,21	13,63

formationsrate liegt um so höher, je schwerer die neurologischen Ausfallserscheinungen bzw. die histologischen Veränderungen ausgeprägt sind. Darüber hinaus findet sich auch eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auftretens der Lähmungen; je länger der Zeitraum zwischen Injektion des Antigens und erstmaligen Auftreten der Lähmungen war, um so höher lag die Transformationsrate der Lymphocytenkulturen mit Zusatz von Hirnextrakt.

2. *Ergebnisse bei der experimentellen Immunthyreoiditis.* Die Ergebnisse der histologischen Thyroideauntersuchungen bei den mit Schilddrüsenextrakt sensibilisierten Tieren sind in der Tabelle 10 zusammengefaßt. Histologisch wurde eine Immunthyreoiditis in 71% der sensibilisierten Tiere beobachtet. Das Befinden der Tiere war 30 Tage nach Sensibilisierungsbeginn gut. Zirkulierende Antikörper konnten mit der passiven Hämagglutinationstechnik in 15 der 31 Tiere nachgewiesen werden. Die Titer betrugen bis zu 1:1024. Bei der Immunfluoreszenztechnik konnten ebenfalls bei der Hälfte der untersuchten Tiere zirkulierende Antikörper, die spezifisch an die Schilddrüsenepithelien gebunden waren, gefunden werden. Bei den Kontrolltieren wurde bei 3 von 31 Tieren Schilddrüsenantikörper niedrigen Titers nachgewiesen. Die serologischen Ergebnisse zeigten allerdings keine Korrelation zu dem Ausmaß der histologisch nachgewiesenen Schilddrüsenveränderungen.

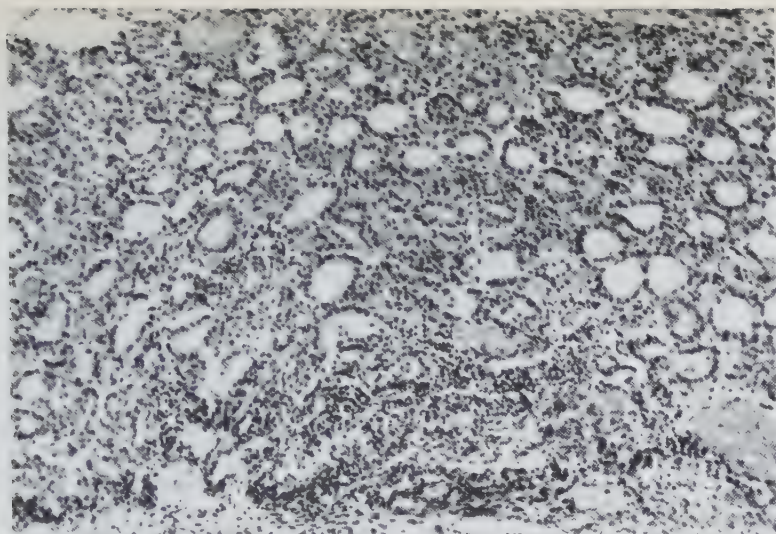


Abb. 2. Histologischer Schnitt der Schilddrüse eines Meerschweinchens mit experimenteller Immunthyreoiditis

Tabelle 9

Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes bei Tieren mit experimenteller Immunthyreoiditis. Die Zahlen geben die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Transformationsraten in Promille für die Lymphocytenkulturen ohne Zusatz (N-Kultur), für Kulturen mit Zusatz von autologem Thyreoideaextrakt (T-Kultur), für Kulturen mit autologem Leberextraktzusatz (L-Kultur) und für Kulturen mit Zusatz von Phytohämagglutinin (P-Kultur) wieder. Die in Kursiv hervorgehobenen Werte der T- und L-Kulturen unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,02$) von dem Wert der N-Kultur

	Transformationsrate in Promille		
	Sensibilisierte Tiere (30)	Mit Freundschem Adjuvans be- handelte Tiere (10)	Unbehandelte Tiere (26)
N-Kultur	28,50 ± 18,69	31,66 ± 25,35	16,58 ± 8,15
T-Kultur	<i>83,16 ± 33,76</i>	48,75 ± 29,48	15,26 ± 10,25
L-Kultur	<i>53,86 ± 28,55</i>	55,00 ± 24,73	36,92 ± 22,10
P-Kultur	107,26 ± 33,76	5,25 ± 34,75	183,33 ± 20,10

Die Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes sind in der Tabelle 9 zusammengefaßt. Bei den gegen homologe Thyreoidea sensibilisierten Tieren konnte regelmäßig eine ausgeprägte Steigerung der Transformationsrate bei Zusatz von Thyreoideaextrakt gefunden werden. Ein Vergleich des Schweregrades der histologischen Schilddrüsenveränderungen und der Transformationsrate zeigt, daß bei der Immunthyreoiditis

diese Befunde korrelieren. Je intensiver die morphologischen Merkmale der Thyreoiditis nachweisbar sind, um so höher liegt die Transformationsrate der Lymphocyten bei Kontakt mit autologem Schilddrüsenextrakt (Tabelle 10). Die Steigerung der Transformationsrate läßt sich aber nicht nur mit Schilddrüsenextrakt, sondern auch mit anderen Organextrakten, hier Leberextrakt, auslösen. Danach liegt eine organspezifische Stimulierung der Lymphocyten nicht vor, vielmehr kann die Transformationsbereitschaft der Lymphocyten von Tieren mit Immunthyreoiditis durch

Tabelle 10. Mittelwerte der Transformationsraten der Lymphocytenkulturen mit Zusatz von autologem Thyreoideaextrakt (T-Kulturen) der Tiere mit experimenteller Immunthyreoiditis, die nach dem Schweregrad der histologischen Thyreoideaänderungen als $\emptyset$, + oder ++ eingestuft wurden

Schweregrad des histologischen Befundes	Zahl der Tiere	Mittlere Transformationsrate der T-Kulturen in Promille
$\emptyset$	9	76,66
+	14	82,71
++	8	91,25

$\emptyset$ = Keine pathologischen Schilddrüsenveränderungen. + = Lokalisierte oder mäßige diffuse Infiltration des interstitiellen Bindegewebes mit mononucleären Zellen ohne Nekrosen von Schilddrüsenazini. ++ = Massive Infiltration des interstitiellen Bindegewebes und Zerstörung zahlreicher Schilddrüsenfollikel.

eine Reihe von Organextrakten, mit denen Antigenverwandtschaft besteht, ausgelöst werden. Diese Ergebnisse weisen auf die Bedeutung gereinigter Antigene bei immunologischen Untersuchungen hin. Parallelversuche unter Verwendung von Thyroglobulin statt Thyreoideaextrakt müssen zeigen, ob sich hier die unspezifische Stimulierung durch Leberextraktantigen ausschalten läßt.

3. *Ergebnisse bei der experimentellen Hepatitis.* Die histologischen Untersuchungen der Lebern sensibilisierter Mäuse zeigten in 78% Leberveränderungen, die denen der chronischen Hepatitis des Menschen entsprechen. Von den 22 sensibilisierten Tieren zeigten 5 keine Leberveränderungen, 14 eine teils diffuse, teils herdförmige Vermehrung der Kupfferschen Sternzellen und eine mäßige Infiltration der periportalten Felder mit mononucleären Zellen. Bei 3 Tieren wurden umfangreiche Leberparenchymzellnekrosen bei schweren entzündlichen Veränderungen festgestellt. Die Lymphknotenlymphocyten von sensibilisierten Tieren zeigten im Lymphocytentransformationstest bei autoradiographischer Auswertung im Gegensatz zu den Lymphocyten der Kontrolltiere Ergebnisse, die in Tabelle 11 zusammengefaßt sind. Danach war die Transformationsrate der Lymphocyten bei Zugabe des Leberextraktes erhöht. Parallele Untersuchungen mit einem autologen Nierenextrakt lassen keine wesent-

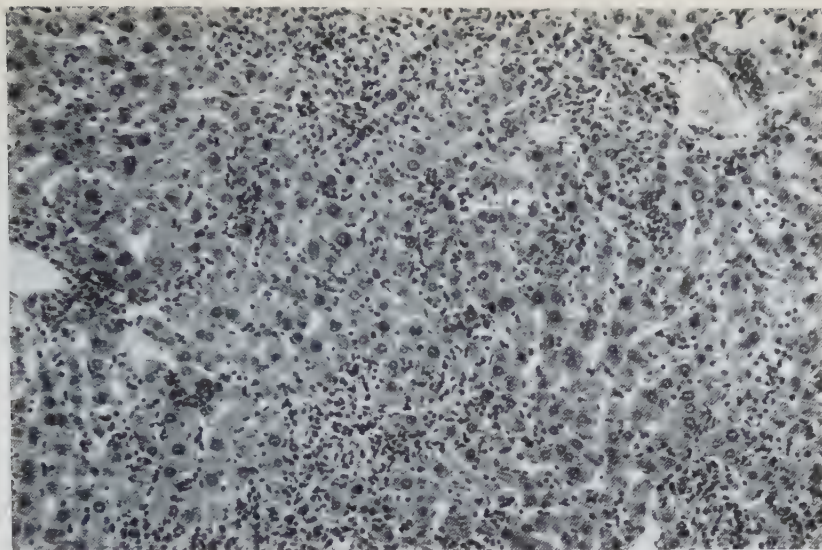


Abb. 3. Histologischer Schnitt der Leber einer Maus mit experimenteller Hepatitis

Tabelle 11. Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes bei Tieren mit experimenteller Hepatitis. Die Zahlen geben die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Transformationsraten in Prozent für die Lymphocytenkulturen ohne Zusatz (N-Kultur), für die Kulturen mit Zusatz von isologem Leberextrakt (L-Kultur), für die Kulturen mit Zusatz von isologem Nierenextrakt (R-Kultur) und für Kulturen mit Phytohämagglutininzusatz (P-Kultur) wieder. Der in Kursiv hervorgehobene Wert der L-Kultur unterscheidet sich signifikant ($p \leq 0,02$) von dem Wert der N-Kultur

Transformationsrate in Prozent			
	Sensibilisierte Tiere (22)	Mit Freundschem Adjuvans behandelte Tiere (24)	
N-Kultur	6,30 ± 1,31	6,92 ± 1,18	
L-Kultur	<i>19,00 ± 9,76</i>	5,92 ± 1,13	
R-Kultur	7,45 ± 3,49	6,18 ± 1,86	
P-Kultur	22,20 ± 18,62	22,61 ± 16,17	

liche Steigerung der Transformationsrate der kultivierten Lymphocyten erkennen.

4. Ergebnisse bei der nephrotoxischen Serumnephritis. Bei der histologischen Untersuchung der Nieren der Ratten, die mit Kaninchen-Antirattenserum behandelt wurden, fand sich in der Regel entsprechend der Abtötung der Tiere am 12. Tag nach der ersten Serumapplikation eine Frühreaktion der Glomerulonephritis mit Vergrößerung des Kernvolumens der Zellen des Mesangiums. Die leukocytaire Infiltration im Bereich des Glomerulum zeigte wechselnde Intensität. In den meisten Präparaten

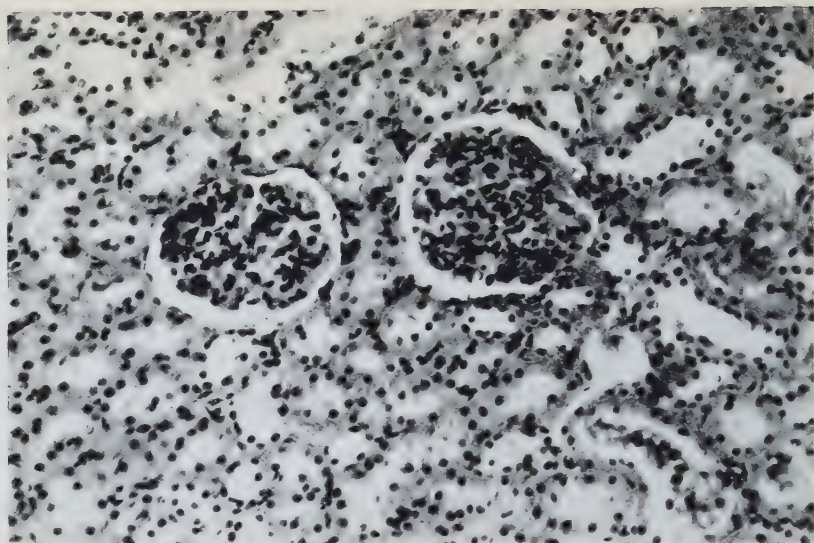


Abb. 4. Histologischer Schnitt der Niere einer Ratte mit nephrotoxischer Serumnephritis

Tabelle 12. Ergebnisse des Lymphocyten transformationstestes bei Ratten, die zur Erzeugung einer nephrotoxischen Serumnephritis mit Kaninchen-Antirattennierenserum injiziert wurden und bei Ratten, die mit Kaninchennormalserum behandelt wurden. Die Lymphocyten, die in den Kulturen mit verschiedenen Zusätzen gezüchtet wurden, wurden teilweise aus der Ductus thoracicus-Lymphpe (DL), in den meisten Fällen aus Lymphknoten der Tiere (LL) gewonnen. Die Zahl der untersuchten Tiere ist jeweils in Klammern angegeben

Zusatz zur Kultur	Transformationsrate in Prozent			
	Mit Antinierenserum behandelte Ratten		Mit Normalserum behandelte Ratten	
	LL (18)	DL (6)	LL (11)	DL (6)
Ø	1,4	2,3	0,6	1,2
Phytohämagglutinin	29,4	18,8	26,8	24,3
Autologer Nierenextrakt	1,7	3,6	1,6	1,5
Antinierenserum	1,8	3,4	3,3	3,8
Autologer Nierenextrakt + Antinierenserum	1,9	3,6	2,0	2,4
Autologer Nierenextrakt + Normalserum	1,2	3,5	1,6	2,0

ließ sich eine erhöhte Eiweißpermeabilität und eine Leukodiapedese nachweisen. Die Nieren der Ratten, die mit Kaninchennormalserum injiziert wurden, zeigten durchwegs eine unauffällige Nierenhistologie.

Mit der Immunfluoreszenztechnik konnte die Bindung von Kaninchen-Gammaglobulin an die Glomeruli der Ratten mit nephrotoxischer Serum-

nephritis bei 25 der 27 Tiere nachgewiesen werden. Ratten-Gammaglobulin konnte fluoreszenzserologisch in diesen Fällen nur viermal festgestellt werden. Mit der Boyden-Technik schließlich konnten bei 16 von 27 Tieren zirkulierende Nierenautoantikörper bestimmt werden.

Die Ergebnisse des Lymphocytenanttransformationstestes sind in der Tabelle 12 wiedergegeben. Die Lymphocyten der Ratten, die Immuns serum gegen Rattennieren erhalten hatten, zeigten lediglich bei Zusatz von Kaninchenserum eine geringe Steigerung der Transformationsrate, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Insgesamt lag die Zahl der transformierten Zellen bei dieser Untersuchungsgruppe niedriger als bei den Kontrolltieren, die Kaninchennormalserum injiziert bekamen. Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, daß das Kaninchenimmuns serum gegen Rattenniere auch eine Lymphocyten schädigung bewirkte, d. h. gewissermaßen im Sinne eines Antilymphocyten serum die Transformationsfähigkeit der Lymphocyten beeinträchtigt. Die Zahl der transformierten Zellen lag schließlich bei den Kulturen mit Ductus thoracicus-Lymphocyten durchschnittlich höher als bei Kulturen mit Lymphknotenlymphocyten. Insgesamt konnte bei der nephrotoxischen Serumnephritis der Ratte keine Korrelation zwischen der histologisch nachweisbaren Organschädigung und der Transformationsrate bei Zusatz von Nierenantigen gefunden werden. Auch der Zusatz von Kaninchenserum führte nicht zu einer signifikanten Steigerung der Zahl transformierter Zellen. Die Möglichkeit einer Schädigung der gezüchteten Lymphocyten durch das Kaninchen-Antirattennierens serum muß in Erwägung gezogen werden.

Diskussion

Die Diagnostik autoimmunologischer Prozesse ist dadurch erschwert, daß die heute gebräuchlichen serologischen Nachweismethoden eindeutige Rückschlüsse auf die Pathogenese bzw. die Aktivität immunologischer Vorgänge nicht zulassen. Autoimmunologische Prozesse werden in der Pathogenese einer Reihe meist chronisch verlaufender Organerkrankungen diskutiert [4, 11, 24, 31]. Die Annahme, daß es sich bei diesen Erkrankungen um Autoimmunopathien handelt, stützt sich auf eine Reihe indirekter Beweise, so auf die klinische Verlaufsform, die insbesondere durch ein autonomes Fortschreiten der Krankheit gekennzeichnet ist, morphologische Merkmale, hier insbesondere die Infiltration des erkrankten Organs mit mononucleären Zellen und den Nachweis zirkulierender meist organspezifischer Autoantikörper. Mit diesen Befunden kann jedoch eine immunologische Pathogenese der Erkrankungen nicht gesichert werden. Günstiger als bei den klinischen Erkrankungen liegen die Untersuchungsbedingungen bei den experimentell induzierten Autoimmunopathien. Hier ist die Immunpathogenese allgemein akzeptiert. Schwierigkeiten ergeben sich bei der Beurteilung, wie diese Vorgänge ausgelöst werden, insbesondere, ob es sich um Reaktionen vom

Soforttyp, die durch zirkulierende Antikörper bewirkt werden, handelt es sich um eine Reaktion vom verzögerten Typ, bei der Lymphocyten die immunologische Reaktion in Gang setzen.

Organspezifische zirkulierende Antikörper werden bei einer großen Zahl von chronisch entzündlichen Organprozessen gefunden. So gelingt es mit hoher Regelmäßigkeit, zirkulierende Antikörper bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoiditis, mit perniziöser Anämie, mit Myasthenia gravis, mit chronischer Hepatitis, mit Colitis ulcerosa, mit chronischer Nephritis oder mit Azoospermie nachzuweisen. Diese zirkulierenden Antikörper werden als Ausdruck immunologischer Vorgänge bei diesen Erkrankungen angesehen. Zwischen dem Titer der zirkulierenden Antikörper und der Schwere der Erkrankung bzw. der Intensität der entzündlichen Veränderungen besteht im allgemeinen keine Korrelation. Vielfach können Antikörper gegen die in Frage kommenden Organantigene nicht nur bei erkrankten, sondern auch bei Gesunden nachgewiesen werden, deren Organe keine histologischen Veränderungen zeigen [24, 27].

Eine pathogenetische Bedeutung der zirkulierenden Antikörper für die Entwicklung der experimentellen Autoaggressionserkrankungen ist ebenfalls nicht gesichert. Bei der experimentellen allergischen Encephalomyelitis werden normalerweise keine Antikörper im Serum gefunden. Bei der experimentellen Immunthyreoiditis existieren zirkulierende Antikörper gegen Thyroglobulin und gegen cytoplasmatische Antigene der Thyrocyten, doch konnte hier keine Beziehung zwischen dem Antikörpertiter und dem Ausmaß der entzündlichen Schilddrüsenveränderungen wahrscheinlich gemacht werden. Der eindrucksvollste Beweis gegen die Bedeutung der zirkulierenden Antikörper ist, daß es durch Übertragung selbst großer Serummengen von Tieren mit experimentellen Autoimmunopathien nicht gelingt, eine gleichartige Erkrankung im Empfängertier auszulösen.

Allerdings muß bei der Beurteilung der Wirkung zirkulierender Antikörper berücksichtigt werden, daß die Tierbestimmungen von spezifischen Organantikörpern im allgemeinen eine Vielzahl von Antikörpern erfassen. Dabei kann es sich neben solchen, die cytotoxische Aktivität besitzen, auch um protektive Antikörper handeln. In einem solchen Fall ist aber eine Korrelation zwischen der Schwere der Organveränderungen und dem Antikörpertiter nicht anzunehmen.

Bei der Mehrzahl der autoimmunologischen Erkrankungen spielt die celluläre Immunität die wesentliche Rolle. Vor allem für die experimentellen Autoimmunopathien konnte nachgewiesen werden, daß hier die Gesetzmäßigkeiten der Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ zutreffen [31, 32]. Bereits das morphologische Substrat, hier insbesondere die meist perivenösen Anhäufungen mononucleärer Zellen, legt diese Vermutung nahe. Für den Nachweis der cellulären Immunität steht heute eine Reihe experimenteller Versuchsmodelle zur Verfügung. Am längsten gebräuchlich ist die Cutanreaktion, wobei die Intensität der

Hautreaktion nach Injektion des entsprechenden Organantigens im allgemeinen eine direkte Beziehung zur Schwere der Erkrankung zeigt [34]. Die Tatsache, daß durch Thymektomie, durch immunsuppressive Medikamente, Röntgenbestrahlung, Antilymphocytenserum oder Lymphdrainage die Entwicklung von Autoimmunprozessen unterdrückt werden kann, wurde ebenfalls als Beweis für die Bedeutung der cellulären Elemente für die Entwicklung autoaggressiver Prozesse angesehen.

Die Rolle der Lymphocyten bei der Entstehung und Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wurde bei den tierexperimentellen Krankheiten vor allem durch Übertragungsversuche [24, 32] bewiesen. So gelingt es, die experimentelle allergische Encephalomyelitis, die Immuthyreoiditis des Meerschweinchens, die experimentelle Hepatitis der Maus u. a. mit Lymphocyten von erkrankten Tieren auf normale Tiere zu übertragen. In autoradiographischen Untersuchungen wurden die übertragenen Zellen nicht nur in den Lymphknoten und der Milz, sondern auch in dem geschädigten Organ vermehrt nachgewiesen [36]. Die Stichhaltigkeit dieser Übertragungsexperimente wird allerdings dadurch eingeschränkt, daß die übertragenen Zellen auch die Fähigkeit zur Bildung zirkulierender Antikörper besitzen.

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von in vitro-Methoden entwickelt, die eine Aussage über die immunologische Aktivität der Lymphocyten ermöglichen und insbesondere auch bei den menschlichen Autoimmunerkrankungen anwendbar sind. Zum in vitro-Nachweis cytotoxischer Effekte von Lymphocyten werden Untersuchungen in der Gewebekultur ausgeführt [7, 17, 23, 26]. Auf diese Weise konnte eine cytotoxische Aktivität von Lymphocyten bei einer Reihe von Autoimmunopathien gegenüber entsprechenden Organzellkulturen nachgewiesen werden. Bei diesen Untersuchungen darf allerdings nicht übersehen werden, daß die gezüchteten Gewebe und die Lymphocyten meist nicht autolog, sondern homolog sind und damit eine Homotransplantationsreaktion der Lymphocyten gegen die Organzellen als Ursache cytotoxischer Effekte denkbar ist.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß der Lymphocytenanttransformationstest als diagnostisches Verfahren zum Nachweis der immunologischen Aktivität von Lymphocyten bei Autoimmunerkrankungen anwendbar ist. Dabei ergeben sich bei den einzelnen geprüften Erkrankungen Unterschiede. Nach unseren Untersuchungen findet sich bei der chronischen Hepatitis, der primär chronischen Polyarthrit und dem Lupus erythematodes eine durchschnittliche Steigerung der Transformationsrate auf das Dreifache. Bei der primär chronischen Polyarthrit ergibt er ebenso häufig positive Resultate wie der Rheumafaktor, wobei die Steigerung der Transformationsrate im allgemeinen früher nachweisbar wird. Bei Lebererkrankungen wird der LTT nur bei der chronisch aggressiven und der chronisch persistierenden Form der chronischen Hepatitis

sowie der aktiven Cirrhose positiv; damit ist er dem Nachweis zirkulierender Antikörper deutlich überlegen. Demgegenüber finden sich positiv zu wertende Ergebnisse bei Colonerkrankungen auch außerhalb der Colitis ulcerosa: wiederholt wurde auch bei normalem Colonschleimhautbefund eine Steigerung der Transformationsrate nachweisbar.

Ähnlich liegen die Verhältnisse auch bei den experimentellen Autoimmunopathien. So lassen sich bei der experimentellen Immunthyreoiditis und der experimentellen Immunencephalomyelitis sichere Unterschiede gegenüber den Kontrollkulturen im Sinne einer Erhöhung der Transformationsraten finden, während sie bei der nephrotoxischen Serumnephritis nicht eindeutig sind. Die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse ist teilweise erkennbar.

Die morphologische Unterscheidung transformierter Zellen von den unveränderten Lymphocyten ist vielfach schwierig, wie in den zuverlässigeren autoradiographischen Untersuchungen nachgewiesen werden kann. Diese Schwierigkeiten bestehen insbesondere bei den Lymphknotenlymphocyten, aber auch bei den Blutlymphocyten einiger Tierspecies, z. B. der Ratte, während sie bei den Blutlymphocyten des Menschen weniger ins Gewicht fallen. Obwohl die morphologischen Unterschiede bei Lymphocyten, die aus der peripheren Zirkulation stammen, im allgemeinen eindeutiger sind, besteht hier wiederum die Möglichkeit einer Verwechslung mit Monocyten bzw. Histiocyten, die cytologisch oft nur schwer von transformierten Zellen zu unterscheiden sind. Hier hilft auch die Autoradiographie nicht weiter, da diese Zellen teilungsfähig sind. Bei Züchtung von Blutlymphocyten ist daher eine Abtrennung der übrigen weißen Blutkörperchen von den Lymphocyten vor Ansetzen der Kulturen notwendig, die wie in unseren Untersuchungen durch Ausnützen der unterschiedlichen Haftfähigkeit der Leukocyten an der Glaswand oder an einer Nylonsäule erfolgen kann.

Die Transformationsrate hängt wesentlich davon ab, aus welchem Organ die Lymphocyten stammen. So fanden wir in unseren Versuchen, daß die Transformationsrate peripherer Lymphocyten aus dem Blut oder der Ductus thoracicus-Lymphe zwei- bis viermal höher liegt als die der Lymphknotenlymphocyten. Es ist daher anzunehmen, daß die immunkompetenten Zellen unter den kleinen Lymphocyten in der Zirkulation wesentlich häufiger anzutreffen sind als in den Lymphknoten.

Die Lymphocytentransformation hängt weiterhin von Art und Dosierung des zugesetzten Antigens ab. Bereits die Aufbereitung des Antigens ist von Wichtigkeit. So ergeben sich Unterschiede, wenn ein Organextrakt durch mechanische Zerkleinerung oder durch Behandlung mit Ultraschall homogenisiert wurde. Zwar ist in Organextrakten, mit denen eine Autoimmunopathie durch Sensibilisierung von Versuchstieren ausgelöst wurde, das wirksame Antigen sicherlich mitenthalten, doch kommt in Extrakten eine Fülle weiterer Faktoren hinzu, die, wie z. B.

proteolytische Fermente, eine Schädigung der gezüchteten Lymphocyten bewirken können, so daß eine Steigerung der Transformationsrate der Lymphocyten ausbleibt. Ein definiertes Antigen, etwa Thyroglobulin bei der Immunthyreoiditis oder die Myelinfraktion des Nervengewebes bei der experimentellen allergischen Encephalomyelitis, sind daher unbedingt vorzuziehen. Bei den klinischen Untersuchungen steht allerdings in den meisten Fällen ein definiertes Antigen nicht zur Verfügung, so daß wie in unseren Untersuchungen bei der chronischen Hepatitis, der primär chronischen Polyarthrits und der Colitis ulcerosa ein nicht näher definierter Organextrakt verwendet werden mußte. Jüngste Veröffentlichungen über das Vorhandensein eines Antigens der Leber, das eine chronische Hepatitis zu induzieren vermag und zur Bildung spezifischer zirkulierender Antikörper führt, lassen Kontrolluntersuchungen mit dem Lymphocytenanttransformationstest unter Verwendung dieses leberspezifischen Antigens bei chronischen Lebererkrankungen indiziert erscheinen [8a, 21a]. Bei Colonextrakten liegen die Verhältnisse noch schwieriger, da der Darm mit Bakterien besiedelt ist und somit unterschiedliche bakterielle Antigene zugesetzt werden. Die Organextrakte sollten beim Lymphocytenanttransformationstest immer autolog sein, da bei Verwendung eines homologen Extraktes eine Steigerung der Transformationsrate im Sinne des Mixed Lymphocyte Culture Tests zu erwarten ist. In unseren Untersuchungen mit der primär chronischen Polyarthrits, die teilweise mit einem eingefrorenen homologen Synovialextrakt vorgenommen wurden, konnte nachgewiesen werden, daß durch diesen eine Steigerung der Transformationsrate nicht bewirkt wurde. Dies geht auch aus den Kontrolluntersuchungen, die mit Lymphocyten von Patienten mit anderen Gelenkerkrankungen angestellt wurden, hervor.

Was für die qualitative Zusammensetzung des Antigens gilt, ist noch wichtiger bei den quantitativen Aspekten. Untersuchungen von GIRARD u. Mitarb. [12] mit Phytohämagglutinin und anderen Antigenen haben gezeigt, daß eine Abhängigkeit der Transformationsrate von der Menge des zugesetzten Antigens besteht. Bei Steigerung der Antigenmenge kommt es zu einem Ansteigen der Transformationsrate. Es gibt schließlich eine maximale Dosierung, über die hinaus eine weitere Zunahme der Zahl transformierter Zellen nicht zu beobachten ist. In unseren Untersuchungen wurden daher immer gleiche Mengen (0,1 g Feuchtgewicht des jeweiligen Organextraktes) zugefügt.

Für die Beurteilung des Lymphocytenanttransformationstestes ist weiterhin wichtig, daß die Transformationsfähigkeit der Lymphocyten von einer Reihe von Faktoren beeinflußt werden kann, wie durch Corticoide, immunsuppressive Medikamente und Röntgenstrahlen. Auch ist die Transformationsfähigkeit der Lymphocyten bei einer Reihe von Erkrankungen des reticulo-histiocytären Systems, wie der lymphatischen Leukämie, der Lymphogranulomatose u. a., beeinträchtigt.

Untersuchungen an Ductus thoracicus-Lymphocyten haben ergeben, daß auch in vivo eine Transformation der Lymphocyten vor sich geht. Wird sensibilisierten Tieren wiederholt das spezifische Antigen injiziert, so tauchen in den Lymphknoten und in der Lymphe des Ductus thoracicus vermehrt transformierte Zellen auf. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich bei den transformierten Lymphocyten um die für das jeweilige Antigen immunkompetenten Zellen handelt. Diese Vorstellung würde im Einklang mit der Clonal Selection Theorie von BURNET stehen, nach der durch Reizung mit einem Antigen Klone durch Vermehrung einzelner für dieses Antigen sensitiver Lymphocyten gebildet werden. Dieser Auffassung steht jedoch der Befund entgegen, daß etwa durch Phytohämagglutinin oder durch Antilymphocytenserum stimulierte Lymphocyten ihre spezifische immunologische Aktivität verlieren. Die Diskussion über die Bedeutung des Phänomens der Lymphocytentransformation ist noch nicht abgeschlossen.

Insgesamt darf man aber doch annehmen, daß die erhöhte Transformationsbereitschaft von Lymphocyten unter dem Einfluß von Antigenen Ausdruck der immunologischen Aktivität dieser Zellen ist. Diese Tatsache gilt auf Grund der vorliegenden Untersuchungen auch für die Autoimmunerkrankungen. Bei Patienten mit primär chronischer Polyarthrit und mit Lupus erythematosus disseminatus acutus kommt es zu einer Zunahme des Prozentsatzes transformierter Lymphocyten bei Zugabe des jeweiligen antigenen Extraktes auf das Zwei- bis Vierfache. Das gleiche gilt auch für die chronische Hepatitis, bei der die Frage der Autoimmunpathogenese insbesondere deshalb noch umstritten ist, weil sich ein leberspezifisches Antigen bislang nicht isolieren ließ. Bei der Colitis ulcerosa sind die Ergebnisse schwieriger zu beurteilen, da hier mit der Colonschleimhaut zugeführte unterschiedliche bakterielle Antigene die Ergebnisse des Lymphocytentransformationstestes beeinflussen. Untersuchungen bei der experimentellen allergischen Encephalomyelitis und der experimentellen Immuntyreoiditis zeigen darüber hinaus, daß die Transformationsrate der Lymphocyten bei Zusatz des autologen Organextraktes eine Korrelation zur Schwere der histologischen Veränderungen bzw. des klinischen Bildes zeigen. Auf Grund der vorliegenden Befunde sind ähnliche Beziehungen auch bei den untersuchten menschlichen Erkrankungen wahrscheinlich. Falls größere Untersuchungsreihen diese Annahme bestätigen, wird der Lymphocytentransformationstest im Gegensatz zu den bislang üblichen Methoden zum Nachweis zirkulierender Antikörper auch einen Rückschluß auf die Akuität einer Autoimmunerkrankung bzw. die Aktivität immunologischer Prozesse gestatten. Er ist damit eine wertvolle Methode nicht nur für die Diagnostik, sondern auch für die Verlaufskontrolle von Autoimmunprozessen. Die vorliegenden Ergebnisse mit dem Lymphocytentransformationstest beweisen, daß die celluläre Abwehr, und hier insbesondere die Lymphocyten,

bei der Entwicklung einer Reihe chronisch entzündlicher Erkrankungen eine wesentliche Rolle spielen. Sie sind ein Argument dafür, daß autoimmunologische Prozesse in der Pathogenese der chronischen Hepatitis, der primär chronischen Polyarthrit, des Lupus erythematosus disseminatus acutus und auch der Colitis ulcerosa eine Rolle spielen.

Literatur

1. ASTALDI, G.: Das Phytohämagglutinin und das Problem der Lymphozyten. *Med. Klin.* **59**, 368 (1964).
2. BOLLMANN, J. L., J. C. CAM, and J. H. GRINTLAY: Techniques for collection of lymph from the liver, small intestine or thoracic duct of the rat. *J. Lab. clin. Med.* **33**, 1349 (1948).
3. COOPER, E. H., P. BARKHAN, and A. J. HALE: Observations on the proliferation of human leucocytes cultured with phytohaemagglutinin. *Brit. J. Haemat.* **9**, 101 (1963).
4. DAMESHEK, W.: Autoimmunity. Theoretical aspects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **124**, 6 (1965).
5. DELBARRE, F., A. KAHOM, B. AMOR et G. KRASSININE: Le ragocyte synovial. Son intérêt pour le diagnostic des maladies rhumatismales. *Presse méd.* **73**, 2129 (1964).
6. Documenta Geigy. Wissenschaftliche Tabellen 1960.
7. DUMONDE, D. C., W. T. HOWSEN, and R. A. WOLSTENCROFT: The Role of Macrophages and Lymphocytes in Reactions of Delayed Hypersensitivity. In: *Immunopathology*, p. 263. Ed. P. A. MIESCHER and P. GRABAR. Basel: Schwabe 1967.
8. ELVES, M. W.: *The Lymphocytes*. London: Lloyd-Luke 1966.
- 8a. EMETAROM, N., D. NELKEN, and J. H. BOSS: Organ specific antigens in rat liver. *Israel J. med. Sci.* **3**, 809 (1967).
9. FISCHER, R., u. A. GROPP: Cytologische und cytochemische Untersuchungen an normalen und leukämischen in vitro gezüchteten Blutzellen. *Klin. Wschr.* **42**, 111 (1964).
10. FRIOU, G. I.: Antinuclear antibodies. Diagnostic significance and methods. *Arthr. and Rheum.* **10**, 151 (1967).
11. GEORGE, M., and J. H. VAUGHAN: In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **111**, 554 (1962).
12. GIRARD, J. P., N. R. ROSE, M. L. KUNZ, S. KOBAYASHI, and C. E. ARBESMAN: In vitro lymphocyte transformation in atopic patients induced by antigens. *J. Allergy* **39**, 65 (1967).
13. GOWANS, J. L., and D. D. MCGREGOR: The immunological activities of lymphocytes. *Progr. Allergy* **9**, 1 (1965).
14. GROPP, A., u. R. FISCHER: Ergebnisse der Züchtung von Lymphozyten in vitro. *Klin. Wschr.* **44**, 665 (1966).
- 14a. HARDER, H., u. W. DÖLLE: Das Syndrom der lupoiden Hepatitis. *Gastroenterologia* **100**, 220 (1963).
15. HIRSCHHORN, K., F. BACH, R. L. KOLODNY, I. L. FIRSCHEIN, and N. HASHEM: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Science* **142**, 1185 (1963).
16. HOLM, G., P. PERLMANN, and B. WERNER: Phytohaemagglutinin induced cytotoxic action of normal lymphoid cells on cells in tissue culture. *Nature (Lond.)* **203**, 841 (1964).
17. JERNE, N. K., A. A. NORDIN, and C. HENRY: The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells. In: *Cell Bound Antibodies*. Ed. D. B. AMOS and H. KOPROWSKI, p. 109. Philadelphia: Wistar Institute Press 1962.

18. KIES, M. M., and E. G. ALVORD: Allergic Encephalomyelitis. Proceedings of a Symposium. Springfield (Ill.): Thomas 1959.
19. LINDER, A.: Statistische Methoden. Basel-Stuttgart: Birkhäuser 1964.
20. MACHANESS, G. B., and R. V. BLANDEN: Cellular immunity. Progr. Allergy **11**, 89 (1967).
21. McMASTER, P. R. B., E. M. LERNER, and E. D. EXUM: Experimental allergic thyroiditis in inbred guinea pigs. Some immunologic and pathologic aspects. Fed. Proc. **20**, 38 (1961).
- 21a. MEYER ZUM BUESCHENFELDE, K. H.: Untersuchungen über die immunbiologische Bedeutung löslicher Leberproteine. Z. ges. exp. Med. **148**, 131 (1968).
- 21b. MIESCHER, P. A.: Der viszerale Lupus erythematodes. Helv. med. Acta. Suppl. **16**, 33, 61 (1966).
- 21c. NASPITZ, CH. K., and M. RICHTER: The action of Phytohemagglutinin in vivo and in vitro. A review. Progr. Allergy **12**, 1 (1968).
22. PEARSE, A. G. E.: Histochemistry. London: Churchill 1960.
23. PERLMANN, P., and G. HOLM: Studies on the mechanism of lymphocyte cytotoxicity. In: Immunopathology. Ed. P. A. MIESCHER and P. GRABAR, p. 325. Basel: Schwabe 1967.
24. ROITT, I. M., and D. DONIACH: Delayed hypersensitivity in autoimmune disease. Brit. med. Bull. **23**, 66 (1967).
25. ROSE, N. R., J. H. KITE, and T. K. DOEBBLER: Experimental autoimmune thyroiditis. In: Mechanism of Cell and Tissue Damage Produced by Immune Reactions. Ed. P. GRABAR and P. MIESCHER, p. 161. Basel: Schwabe 1962.
26. ROSENAU, W., and H. D. MOON: The specificity of the cytolytic effects of sensitized lymphoid cells in vitro. J. Immunol. **93**, 910 (1964).
27. SCHEIFFARTH, F., H. WARNATZ u. H. G. ESSING: Serological studies of autoantibodies in acute and chronic liver disease. Int. Arch. Allergy **28**, 240 (1965).
28. — — u. K. MAYER: Studies concerning the importance of mononuclear cells in the development of experimental hepatitis. J. Immunol. **98**, 396 (1967).
29. — —, H. GÖTZ, W. FRENGER u. G. BERG: Immunologische Methoden. In N. HENNING: Klinische Laboratoriumsmethoden. München: Urban & Schwarzenberg 1965.
30. SCHWARTZ, R. S.: Immunosuppressive Therapy. In: Immunopathology, Ed. P. A. MIESCHER and P. GRABAR, p. 360. Basel: Schwabe 1967.
31. STEFFEN, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie sowie ihre klinische Anwendung. Stuttgart: Thieme 1967.
32. TURK, J. L.: Delayed hypersensitivity. North Holland 1967.
33. UNANUE, E. R., and F. J. DIXON: Experimental glomerulonephritis. VI. The autologous phase of nephrotoxic serum nephritis. J. exp. Med. **121**, 715 (1965).
34. VARELZIDIS, A., and J. L. TURK: The significance of reactions to the intradermal injection of autologous granulocytes, mononuclear cells and serum. Brit. med. J. **1966** II, 379.
35. WAKSMAN, B. H.: Experimental allergic encephalomyelitis and the autoallergic diseases. Int. Arch. Allergy Suppl. **14** (1954).
36. WARNATZ, H., F. SCHEIFFARTH, F. WOLF, and J. H. SCHMIDT: Autoradiographic experiments concerning the importance of mononuclear cells in experimental hepatitis. J. Immunol. **98**, 402 (1967).
37. ZIFF, M., P. BROWN, J. LOSPALLUTO, J. BADIN, and C. McEWEN: Agglutination and inhibition by serum globulin in the sensitized sheep cell agglutination reaction in rheumatoid arthritis. Amer. J. Med. **20**, 500 (1956).

Priv.-Doz. Dr. H. WARNATZ
Abteilung für klinische Immunologie
des Universitätskrankenhauses
Erlangen-Nürnberg
8520 Erlangen, Krankenhausstraße 12